

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

**2 801 226**

②1 N° d'enregistrement national : **99 14751**

⑤1 Int Cl<sup>7</sup> : B 01 J 13/00, B 01 J 13/02, A 61 K 9/16, 9/51, 9/52, 7/00

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 23.11.99.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 25.05.01 Bulletin 01/21.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *FLAMEL TECHNOLOGIES Société  
anonyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *TOURAUD FRANCK et BRYSON  
NATHAN.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : *CABINET PLASSERAUD LYON.*

⑤4 **SUSPENSION COLLOIDALE DE PARTICULES SUBMICRONIQUES DE VECTORISATION DE PRINCIPES  
ACTIFS ET SON MODE DE PREPARATION.**

⑤7 L'invention concerne une suspension de particules de vectorisation (PV) de principes actifs (PA). Ces PV sont à base de polyaminoacides PAA. Elles ont un diamètre hydrodynamique moyen Dh compris entre 30 et 120 nm et présentent un taux de chargement Ta avec l'insuline compris entre 5 et 25 % de masse d'insuline associée par rapport à la masse de PAA formant les PV. Les PAA sont des copolymères diblocs comprenant des monomères hydrophiles AAI et hydrophobes AAO. L'invention vise, également, un solide pulvérulent à partir duquel sont issues les PV ainsi que la préparation de ce solide et de cette suspension de PV. Cette préparation consiste à copolymériser les N-CarboxyAnhydrides d'AAO et de précurseurs d'AAI, en présence de N-méthylpyrrolidone et de méthanol. On transforme ensuite des précurseurs d'AAI en AAI par hydrolyse acide. Eventuellement, on neutralise, on dialyse, on concentre et on élimine l'eau. On produit ainsi un solide pulvérulent ou des PV en suspension. On associe des PA (comme l'insuline ou des vaccins) à ces PV et on prépare des spécialités pharmaceutiques.

FR 2 801 226 - A1



BEST AVAILABLE COPY

Le domaine de la présente invention est celui des Particules de Vectorisation (PV), utiles pour l'administration de principes actifs (PA). Ces derniers sont, de préférence, des médicaments ou des nutriments pour l'administration à un organisme animal ou humain par voie orale ou nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale, parentérale, etc... Mais il peut s'agir aussi de produits cosmétiques ou de produits phytosanitaires, tels que des herbicides, des pesticides, des insecticides, des fongicides, etc. En terme de nature chimique, les PA plus particulièrement, mais non limitativement, concernés par l'invention sont, par exemple, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides, des polynucléides et des molécules organiques.

La présente invention concerne, plus précisément, des suspensions colloïdales de Particules de Vectorisation, avantageusement de type submicronique, à base de polyaminoacides (PAA). La présente invention vise aussi bien des particules nues en tant que telles, que les systèmes de vecteurs de PA, constitués par les particules chargées par le (ou les) PA considéré(s). La présente invention a également trait à des solides pulvérulents comprenant ces PV. L'invention concerne, également, des procédés de préparation desdites suspensions colloïdales de particules, avec ou sans PA.

L'encapsulation de PA dans les PV a notamment, pour but de modifier leur durée d'action et/ou de les acheminer au lieu du traitement et/ou augmenter la biodisponibilité desdits PA. De nombreuses techniques d'encapsulation ont déjà été proposées. De telles techniques visent, d'une part, à permettre le transport du PA jusqu'à son site d'action thérapeutique, tout en le protégeant contre les agressions de l'organisme (hydrolyse, digestion enzymatique, etc.) et, d'autre part, à contrôler la libération du PA sur son site d'action, afin de maintenir la quantité disponible pour l'organisme au niveau désiré. Les PA concernés par ces avatars de transport et de séjour dans l'organisme sont, par exemple, des protéines mais peuvent être, également, des produits tout autres, des molécules organiques d'origine synthétique ou naturelle. La revue de M.J. HUMPHREY (Delivery system for peptide Drugs, éditée par S. DAVIS et L. ILLUM, Plenum Press, N.Y. 1986), fait état de la problématique concernant l'amélioration de la biodisponibilité des PA et l'intérêt des systèmes de vectorisation et de libération contrôlée.

Parmi tous les matériaux envisageables pour former des PV, les polymères sont de plus en plus utilisés, du fait de leurs propriétés intrinsèques. S'agissant du cahier des charges que l'on souhaite obtenir pour les PV, il est particulièrement exigeant et comprend, notamment, les spécifications suivantes.

- 1 La première spécification recherchée pour les PV serait que le polymère, constituant les PV soit biocompatible, éliminable (par excrétion) et/ou biodégradable et, encore mieux, qu'il soit métabolisé en produits non toxiques pour l'organisme. En outre, il conviendrait que la biodégradation dans l'organisme soit  
5 d'une durée suffisamment courte.
- 2 Les PV auraient avantage à pouvoir former, sans l'aide de solvant organique et/ou de tensioactif, une suspension aqueuse stable.
- 3 Il serait également souhaitable que les PV aient une taille suffisamment faible pour pouvoir subir, en suspension dans un liquide, une filtration stérilisante par un filtre  
10 dont le diamètre des pores est inférieur ou égal à 0,2  $\mu\text{m}$ .
- 4 Il est souhaitable que les PV et les systèmes PV-PA puissent être obtenus par un procédé non dénaturant pour le PA.
- 5 Les PV devraient, avantageusement, permettre de contrôler la vitesse de libération du PA.
- 15 6 Une autre spécification importante serait que les systèmes PV-PA puissent constituer d'excellents médicaments injectables. Cette aptitude améliorée de l'administration par injection – c ; g ; intraveineuse ou intramusculaire – « injectabilité » se caractérise par :  
(i) un volume injecté réduit (pour une dose thérapeutique donnée)  
20 (ii) une viscosité faible  
Ces deux propriétés sont satisfaites lorsque la dose thérapeutique de PA est associée à une quantité minimale de PV. En d'autres termes, les PV doivent avoir un fort taux de chargement en PA.
- 7 Le coût propre aux PV dans une préparation injectable doit être réduit et là encore il convient que les PV aient un fort taux de chargement en PA. En définitive, la fiable  
25 taille et un fort taux de chargement sont des spécifications majeures recherchées pour les PV.
- 8 Il est également avantageux que le polymère, constitutif des PV, n'induisse pas de réponse immunitaire.

30

Les propositions techniques antérieures, décrites infra, ont tenté de satisfaire l'ensemble de ces spécifications. A titre d'illustration, on citera les propositions antérieures (a) à (h) :

- (a) Le brevet US-A-5 286 495 concerne un procédé d'encapsulation par vaporisation de protéines en phase aqueuse, à l'aide de matériaux ayant des charges opposées, à

savoir : l'alginate (chargé négativement) et la polylysine (chargée positivement). Ce procédé de fabrication permet de produire des particules de taille supérieure à 35 µm.

- 5 (b) Par ailleurs, les techniques d'émulsion sont couramment utilisées pour préparer des microparticules chargées de PA. Par exemple, les demandes de brevets WO 91/06286, WO 91/06287 et WO 89/08449 divulguent de telles techniques d'émulsion dans lesquelles on a recours à des solvants organiques pour solubiliser des polymères, par exemple de type polylactique. Mais il s'est avéré que les solvants peuvent être dénaturants, notamment pour les PA peptidiques ou polypeptidiques.
- 10 (c) On connaît, également, des PV biocompatibles appelées protéinoïdes, décrites dès 1970 par X. FOX et K. DOSE dans « Molecular Evolution and the origin of Life », Ed. Marcel DEKKER Inc (1977). Ainsi, la demande de brevet WO 88/01213 propose un système à base d'un mélange de polypeptides synthétiques, dont la solubilité dépend du pH. Pour obtenir les microparticules matricielles selon cette invention, ils solubilisent le mélange de polypeptides, puis avec un changement de pH, ils provoquent la
- 15 précipitation de particules protéinoïdes. Lorsque la précipitation s'effectue en présence d'un PA, celui-ci est encapsulé dans la particule.
- (d) On mentionnera également, pour mémoire, le brevet US 4 351 337 qui relève d'un domaine différent de celui de la vectorisation de PA propre à l'invention. Ce brevet divulgue des implants massiques fixés et localisés à des endroits bien précis de
- 20 l'organisme. Ces implants sont des tubes ou des capsules creuses de taille microscopiques (160 µm et de longueur égale à 2 000 µm), constitués de copolymères de copoly(aminoacides) – e. g. poly(acide glutamique-leucine) ou poly(benzylglutamate-leucine) – obtenus par copolymérisation de monomères de N-carboxyanhydrides d'aminoacides (NCA). L'inclusion d'un PA s'opère par une technique d'évaporation de
- 25 solvant d'un mélange de polymère et de PA.
- Le brevet US 4 450 150 appartient à la même famille que le brevet US 4 351 337 étudié ci-dessus et a essentiellement le même objet. Les PAA constitutifs sont des poly(acide glutamique-éthylglutamate).
- (e) La demande de brevet PCT/FR WO 97/02810 divulgue une composition pour la
- 30 libération contrôlée de principes actifs, comprenant une pluralité de particules lamellaires d'un polymère biodégradable, au moins en partie cristallin (polymère d'acide lactique) et d'un PA absorbé sur lesdites particules. Dans ce cas, la libération du principe actif s'opère par désorption.

(f) La publication « CHEMISTRY LETTERS 1995, 707, AKIYOSHI ET AL » concerne la stabilisation d'insuline par complexation supramoléculaire avec des polysaccharides hydrophobisés par greffage de cholestérol.

5 (g) L'article paru dans « MACROMOLECULES 1997, 30, 4013-4017 » décrit des copolymères composés d'un bloc polypeptide à base de L-phénylalanine, de (-benzyl-L-glutamate ou de O-(tétra-O-acétyl-D-glucopyranosyl)-L-sérine, et un bloc synthétique, tels que la poly(2-méthyl-2-oxazoline) ou la poly(2-phényl-2-oxazoline). Des polymères s'agrègent en milieu aqueux pour former des particules de 400 nm, capables de s'associer avec une enzyme, la lipase. La terme associée signifie ici que la protéine  
10 s'adsorbe sur la particule par un phénomène physique (pas de liaison covalente).

(h) La demande PCT WO 96/29991 a pour objet des particules de polyaminoacides utiles pour la vectorisation de PA. Ces particules ont une taille comprise entre 10 et 500 nm, de préférence entre 30 et 400 nm. Dans les exemples de cette demande PCT, la  
15 taille des particules est mesurée par le rayon de giration. Le rayon de giration des particules obtenues dans ces exemples varie de 55 à 280 nm. Il existe d'autres techniques de mesure de la taille de particules colloïdales. La détermination du diamètre hydrodynamique moyen (Dh) des particules par diffusion quasi élastique de la lumière (QELS) est un exemple de méthode commode de mesure. Dans tout le présent exposé, on prendra pour référence un mode opératoire Md de mesure de Dh.. Md est décrit plus  
20 loin. Ainsi, le Dh des particules selon les exemples du PCT WO 96/29991 s'étend de 150 nm à 750 nm. Il est à remarquer que les PV dont il est question ici sont formées d'un coeur hydrophobe entouré d'une chevelure hydrophile. Le diamètre hydrodynamique de ces objets est inférieur au double de leur rayon de gyration, comme cela est expliqué par exemple dans les ouvrages "Dynamic Light Scattering", B.J. Berne and R. Pecaran (Wiley, 1976) and "Physicochemical Hydrodynamics", R.F Probstein (Wiley 1994).

25 Le taux de chargement Ta des particules s'exprime commodément par le rapport de la masse d'insuline à la masse de PV sec. Selon les exemples du WO 96/29991, avec un PA constitué par de l'insuline, est au mieux de 0,065 mg/mg, soit 6,5 % en poids sec d'insuline par rapport à la masse de PAA. Ta est mesuré selon un mode opératoire Ma décrit plus loin.  
30

Les particules selon le WO 96/29991 se forment spontanément par mise en contact de PAA avec une solution aqueuse. Les PAA comprennent des monomères aminoacides neutres et hydrophobes AAO et des monomères ionisables et hydrophiles AAI.

Ces PAA sont préparés par copolymérisation de NCA de précurseurs d'AAI (e.g. : Glu-OMe) et de NCA d'AAO (e.g. Leu) en solution dans un mélange dioxane/toluène. Le copoly(Glu-OMe)(Leu) obtenu en solution est récupéré par précipitation dans l'eau, filtration et séchage. Ce copolymère est alors soumis à une hydrolyse acide en l'incorporant dans l'acide TriFluoroAcétique (TFA), dans lequel il se dissout. Un copolymère (Glu-O-Na)(Leu) est récupéré après neutralisation, dialyse, filtration et lyophilisation.

Ce coPAA est dispersé dans une solution aqueuse de NaCl et il se forme spontanément une suspension de nanoparticules. Comme indiqué supra, ces dernières sont de taille  $D_h$  supérieure à 150 nm et un taux de chargement à l'insuline  $T_a$  6,50%.

Il ressort donc de ce qui précède que les propositions techniques antérieures sus décrites, et notamment la proposition (h), satisfont incomplètement aux spécifications du nouveau cahier des charges indiqué supra, et, en particulier une aptitude à la stérilisation par filtration, une haute vitesse de dégradation, une adaptabilité aux contraintes de l'administration de médicaments par injection, un faible coût et un fort taux de chargement en PA.

S'agissant de l'aptitude à la filtration stérilisante, il importe que les particules PV soient suffisamment petites pour passer, en suspension dans un liquide, au travers de filtres dont le seuil de coupure est inférieur ou égal à 0,2  $\mu m$ , sans les colmater. De telles facilité et efficacité de stérilisation par filtration sont particulièrement appréciées pour des médicaments injectables.

Concernant l'aptitude à l'injection des PV, il convient, pour une dose donnée de PA, de pouvoir injecter de faibles volumes de suspension liquide, et que cette suspension soit peu visqueuse. Il s'agit de pouvoir réduire les quantités d'excipient (PV) par rapport à la dose thérapeutique visée en PA et de fournir des PV ayant une taille la plus réduite possible, tout en augmentant la capacité de chargement du PA.

S'agissant de la spécification de biodégradabilité des PV, elle est d'autant meilleure que la taille des PV est réduite et permet leur élimination rapide.

En outre, il est appréciable de pouvoir réduire les quantités d'excipient (PV) pour des raisons économiques et pour améliorer la tolérance du médicament injectable.

Dans cet état de fait, un objectif essentiel est de pouvoir fournir de nouvelles PV qui forment spontanément, et sans l'aide de tensioactifs ou de solvants organiques, des suspensions aqueuses stables de PV.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir de nouvelles PV en suspension aqueuse colloïdale stable ou sous forme pulvérulente et à base de poly(aminoacides) (PAA), ces nouvelles PV se devant de satisfaire au mieux aux spécifications 1 à 8 du cahier des charges susvisé.

- 5 Un autre objectif essentiel de l'invention est de perfectionner les particules divulguées dans la demande PCT WO 96/29991.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension nouvelle de PV dont on maîtrise parfaitement les caractéristiques, notamment en termes du taux de chargement en PA et en termes de contrôle de cinétique de libération du PA.

- 10 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des suspensions médicamenteuses injectables. Les spécifications, requises pour de telles suspensions, sont un faible volume d'injection et une faible viscosité. Il importe que la masse de particules colloïdales par dose d'injection soit le plus faible possible et ce sans limiter la quantité du principe actif PA transporté par ces particules, afin de ne pas nuire à l'efficacité thérapeutique.

- 15 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale aqueuse ou un solide pulvérulent comprenant des particules de vectorisation de principes actifs satisfaisant aux spécifications visées ci-dessus et qui constitue une forme galénique appropriée et convenable pour une administration, par exemple orale, à l'homme ou l'animal.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale comprenant des

20 particules de vectorisation de principes actifs filtrable sur des filtres de 0,2  $\mu\text{m}$  à des fins de stérilisation.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer un procédé de préparation de particules (sèches ou en suspension dans un liquide) de PAA utiles, notamment, comme vecteurs de principes actifs, ledit procédé se devant d'être, plus simple à mettre en œuvre, non dénaturant

25 pour les principes actifs et devant en outre toujours permettre une maîtrise fine de la granulométrie moyenne des particules obtenues.

Un autre objectif essentiel de l'invention est l'utilisation des susdites particules en suspension aqueuse ou sous forme solide pour la préparation :

- 30
- de médicaments (e.g. vaccins), en particulier pour administration notamment orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale, les principes actifs de ces médicaments pouvant être, notamment, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides ;

- et/ou de nutriments,
- et/ou de produits cosmétiques ou phytosanitaires,
- et/ou de molécules organiques médicamenteuses.

5 Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir des suspensions de PV submicroniques à base de PAA et susceptibles de servir de vecteur d'un PA, en particulier médicamenteux pour l'administration dudit PA à un organisme humain ou animal, ou bien encore d'un PA nutritionnel, phytosanitaire ou cosmétique.

Un autre objectif de la présente invention est de fournir un médicament, du type système à libération prolongée de principes actifs, qui soit aisé et économique à produire et qui soit, en 10 outre, biocompatible et apte à assurer un très haut niveau de biodisponibilité du PA.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un système de vectorisation de vaccin, qui soit non-immunogène intrinsèquement et en combinaison avec un ou plusieurs antigènes.

15 Les objectifs relatifs aux produits (parmi d'autres) sont atteints par la présente invention qui concerne, tout d'abord, une suspension colloïdale stable de particules structurées submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) PA, ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés (discrets) :

- 20 ○ à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'acides aminés récurrents AAI hydrophiles et AAO neutres hydrophobes, les acides aminés de chaque type étant identiques ou différents entre eux,
- et aptes à associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et 25 à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée, caractérisée :
  - en ce que le ou les AAI des chaînes polymères est (sont) choisi(s) parmi les acides aminés à chaîne latérale ionisable, les acides aminés naturels Glu et Asp sous forme carboxylique et/ou sous forme de sels étant particulièrement 30 préférés,
  - en ce que le ou les AAO des chaînes polymères est(sont) choisi(s) dans le groupe comprenant les acides aminés neutres naturels, de préférence ceux appartenant au sous-groupe comportant : Leu, Ile, Val, Ala, Gly, Phe ;



- en ce que les particules sont stables en phase aqueuse à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s),
- par un taux de chargement  $Ta$  des particules de vectorisation avec l'insuline, exprimé en % de masse d'insuline associée par rapport à la masse et mesuré selon un mode opératoire  $Ma$ ,  $Ta$  étant tel que :

$$7 \leq Ta$$

de préférence,  $8 \leq Ta \leq 50$

et, plus préférentiellement encore,  $10 \leq Ta \leq 30$

- et par un diamètre hydrodynamique moyen  $Dh$  exprimé en nanomètres (nm) et mesuré selon un mode opératoire  $Md$ ,  $Dh$  étant tel que :

$$10 \text{ nm} \leq Dh \leq 150 \text{ nm}$$

de préférence,  $20 \text{ nm} \leq Dh \leq 100 \text{ nm}$ .

Les modes opératoires  $Md$  et  $Ma$  pour les mesures  $Dh$  et  $Ta$  sont détaillés ci-après.

#### Mode opératoire $Md$ :

La poudre pulvérulente de PAA est mise en suspension dans une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,15 M à pH 7,4, 25 °C et à une concentration en polymère comprise entre 0,01 et 0,5 g/l et, de préférence, égale à 0,1 g/l. Cette suspension est agitée 4 heures, puis introduite dans la cellule de diffusion d'un appareil de diffusion de la lumière, de type Brookhaven, fonctionnant avec un faisceau laser de longueur d'onde 488 nm et polarisé verticalement. Le diamètre hydrodynamique est calculé à partir de la fonction d'autocorrélation du champ électrique par la méthode des cumulants, comme décrit dans l'ouvrage « Surfactant Science Series » volume 22, Surfactant Solutions, Ed. R. Zana, chap. 3, M. Dekker, 1984.

#### Mode opératoire $Ma$ :

(a) Préparation d'une solution aqueuse d'insuline : De l'insuline recombinante humaine lyophilisée (Sigma n° 10259) est versée dans une solution HCl 0,1 N durant 5 min à 25°C. Cette solution est ensuite versée dans une solution de tampon phosphate qui est finalement neutralisée par ajout de NaOH de 0,1 N. La solution est laissée ensuite au repos 30 min à température ambiante, puis filtrée sur membrane acrodisc 0,8-0,2 µ. La

masse d'insuline est calculée en fonction du volume souhaité de solution, afin d'obtenir une concentration de 60 ui/ml.

(b) Dispersion des particules de vectorisation en PAA à associer dans la solution

5 d'insuline : Les PV lyophilisés sont ajoutés à la solution d'insuline, à raison de 10 mg PV/ml de solution. Ce mélange est agité au vortex à deux ou trois reprises, puis placée dans un agitateur à basculement à température ambiante pendant 18 heures. La suspension colloïdale est ensuite conservée à 4 °C.

10 (c) Séparation de l'insuline libre de l'insuline associée et dosage de l'insuline libre : La solution, contenant l'insuline et les PV est centrifugée 1 heure sous 60 000 g à 20 °C. Le surnageant est disposé dans des tubes munis d'une membrane d'ultrafiltration (seuil de coupure 100 000Da) et centrifugé sous 3 000 g. 2 heures à 20 °C. L'insuline dans le filtrat est dosée par CLHP.

15 L'un des fondements inventifs de ces nouvelles particules de vectorisation PV, en suspension aqueuse colloïdale stable ou à l'état de solide pulvérulent, tient à la sélection originale d'un groupe de polymères et d'une méthodologie originale permettant d'obtenir des particules de taille submicronique, qui forment une suspension colloïdale aqueuse stable en l'absence de tensioactifs ou de solvants.

20 Un autre fondement inventif de ces nouvelles particules de vectorisation PV, en suspension aqueuse colloïdale stable ou à l'état de solide pulvérulent, tient à la sélection originale d'un groupe de particules structurées submicroniques particulières par leur taux de chargement  $Ta \geq 7\%$  et leur taille  $Dh \leq 150$  nm. Cette sélection est le fruit d'importantes et longues recherches sur le procédé d'obtention des particules. En effet, la réduction de taille et l'augmentation de la capacité de chargement des particules de polyaminoacides n'étaient, à priori, pas évidentes.

25 Ainsi, en mettant en œuvre le procédé d'obtention de nanoparticules de polyaminoacide enseigné dans la demande PCT WO 96/29991, l'homme de l'art n'a pas pu obtenir, « sur mesure », des particules qui répondent au nouveau cahier des charges, tel que défini supra.

30 Finalement, c'est en jouant sur les compositions des polymères et sur les conditions opératoires que les inventeurs ont pu isoler ces particules structurées de très petite taille qui sont à la base de PAA et qui présentent, de manière tout à fait surprenante et inattendue, une capacité de chargement  $Ta$  à l'insuline qui peut être jusqu'à trois fois supérieure à celle propre aux particules selon le WO 96/29991.

La structure des polymères PAA et la nature des acides aminés, sont choisies de telle façon que :

- les chaînes de polymères se structurent spontanément sous forme de particules (**PV**) de petite taille,
- les particules forment une suspension colloïdale stable dans l'eau et en milieu physiologique,
- 5    • les **PV** s'associent avec des protéines ou autres **PA** en milieu aqueux, par un mécanisme spontané et non dénaturant pour la protéine,
- les **PV** libèrent les **PA** en milieu physiologique et, plus précisément, in vivo ; la cinétique de libération est fonction de la nature du polymère PAA précurseur des **PV**.

10    Ainsi, en jouant sur la structure particulière du PAA, on peut contrôler les phénomènes d'association et de libération du **PA** sur le plan cinétique et quantitatif.

Il est du mérite de la demanderesse d'avoir choisi, à titre de matériau constitutif des **PV**, une composition particulière de polyaminoacides qui sont amphiphiles et qui, donc, possèdent des propriétés des **PV** en PAA, à savoir :

- 15       • possibilité de former spontanément des suspensions colloïdales de **PV** compatibles avec le pH des milieux physiologiques rencontrés dans les applications thérapeutiques visées ;
- association spontanée des **PA** avec des **PV** en l'absence d'autre agent que l'eau qui leur sert de solvant et qui, dans le cas des protéines, n'est pas dénaturant ;
- 20       • possibilité de libérer le **PA** du complexe d'association **PA-PV**, dans des conditions physiologiques, avec des profils pharmacocinétique et pharmacodynamique, qui laissent présager des utilisations intéressantes dans le domaine thérapeutique (vectorisation **PA**).

25    et qui, par ailleurs, présentent de nouvelles propriétés qui sont :

- filtrabilité avec seuil de coupure inférieur ou égal à 0,2  $\mu\text{m}$  à des fins de stérilisation,
- biodégradabilité améliorée,
- aptitude à l'injection optimisée,

30    Ces nouvelles propriétés ont pu être obtenues grâce aux fonctions techniques primaires des **PV** qui sont la petite taille nanométrique et le fort taux de chargement.

Pour définir un peu plus ces PAA, on peut indiquer qu'ils peuvent être du type ordonné, séquentiel alterné (blocs) ou du type désordonné, séquentiel aléatoire (statistique).

Ainsi, selon une première forme de réalisation des PV selon l'invention, les PAA constitutifs sont du type « bloc » et sont caractérisés par un rapport molaire  $AAO/(AAI+AAO)$  tel que :

- $10\% \leq AAO/(AAO + AAI) \leq 70\%$ ,
- de préférence,  $20\% \leq AAO/(AAI + AAO) \leq 60\%$
- 5      • et plus préférentiellement encore,  $35\% \leq AAO/(AAI + AAO) \leq 50\%$ .

Avantageusement, la longueur absolue de chaque bloc d'AAO, exprimé en nombre d'AAO est telle que :

- de préférence,  $AAO > 10$ ,
- 10      • et, plus préférentiellement encore,  $20 \leq AAO \leq 100$

Selon une deuxième forme de réalisation des PV selon l'invention, les PAA constitutifs sont du type « statistique » c'est-à-dire préparés par copolymérisation simultanée de monomères de AAI et AAO, et le rapport molaire  $AAO/(AAO + AAI)$  est tel que :

- 15      •  $AAO/(AAO + AAI) > 10\%$
- et, de préférence,  $AAO/(AAO + AAI) \geq 20\%$ ,
- et, plus préférentiellement encore,  $30\% \leq AAO/(AAI + AAO) \leq 70\%$

Avantageusement, la masse molaire  $M_w$  de ces PAA statistiques est telle que :

- 20      •  $M_w \geq 2\,000\text{ g/mol}$ ,
- de préférence,  $M_w \geq 5\,500\text{ g/mol}$ ,
- et plus, préférentiellement encore,  $5\,500\text{ g/mol} \leq M_w \leq 200\,000\text{ g/mol}$ .

Suivant une caractéristique préférée de l'invention, les PAA blocs ou statistiques constitutifs de particules ont des degrés de polymérisation DP compris entre 30 et 600, de préférence entre 50 et 200 et, plus préférentiellement encore, entre 60 et 150.

Avantageusement, les PAA constitutifs des particules PV sont des PAA « diblocs ».

La présente invention vise, non seulement des suspensions de particules nues, telles que définies ci-dessus, mais également des particules comprenant au moins un principe actif PA. De préférence, la suspension selon l'invention est aqueuse et stable. Ces particules, chargées ou non en PA, sont, avantageusement, sous forme dispersée dans un liquide (suspension), de préférence aqueux, mais peuvent également être à l'état de solide pulvérulent, obtenu à partir de la suspension de PV telle que définie ci-dessus.

D'où il s'ensuit que l'invention concerne, outre une suspension colloïdale (de préférence aqueuse) de PV, un solide pulvérulent comprenant des PV et obtenu à partir de la suspension selon l'invention.

- 5 Un autre objet essentiel de l'invention se rapporte à la préparation des particules sélectionnées (telles que décrites ci-avant), aussi bien sous forme de suspension colloïdale que sous forme de solide pulvérulent. Le procédé de préparation considéré consiste, essentiellement, à synthétiser des PAA précurseur et à les transformer en particules structurées.

10 Plus précisément, il s'agit, tout d'abord, d'un procédé de préparation de particules structurées submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s), ces particules étant des arrangements supramoléculaires discrets :

- à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles linéaires, à enchaînements (-AAI hydrophiles et AAO hydrophobes, les aminoacides de chaque type étant identiques ou différents entre eux ;

- 15 •de diamètre moyen  $D_h$ , exprimé en nm et mesuré selon un mode opératoire  $M_d$ , tel que :

$$10 \leq D_h \leq 150,$$

de préférence,  $20 \leq D_h \leq 100$

- 20 •d'une part aptes, à former une suspension colloïdale stable par un simple mélange dans un milieu aqueux, sans qu'il soit nécessaire d'y ajouter un solvant ni de tensioactifs.

- 25 •et d'autre part, aptes à s'associer dans un milieu liquide, avec au moins un PA et, en particulier, avec l'insuline selon un taux de chargement  $T_a$ , exprimé en %, et mesuré selon un mode opératoire  $M_a$  tel que :  $7 \leq T_a$ , de préférence,  $8 \leq T_a \leq 25$ , et, d'autre part, à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et contrôlée.

Ce procédé est caractérisé en ce que :

1. on réalise une copolymérisation de monomères N-CarboxyAnhydrides d'aminoacides (NCA) d'au moins deux types différents, d'une part, des NCA-pAAI (« pAAI » désignant un précurseur d'AAI) et, d'autre part, des NCA-AAO, en présence :

- d'au moins un solvant polaire non aromatique, de préférence choisi dans le groupe comprenant : la N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiméthylSulfoxyde (DMSO), le

DiMéthylAcétamide (DMAc), la pyrrolidone, la NMP étant plus particulièrement préférée,

- et, éventuellement d'au moins un co-solvant protique de préférence choisi dans le groupe comprenant la pyrrolidone, l'eau, les alcools ;  
le méthanol étant particulièrement préféré ;

5

2. on transforme les motifs récurrents pAAI du copolymère précurseur PAA des particules, en motifs récurrents AAI, en mettant en œuvre une hydrolyse, de préférence acide, pour laquelle on ajoute au milieu organique susdécrit une phase aqueuse acide;

10

3. éventuellement on neutralise le milieu réactionnel,
4. éventuellement on purifie le milieu réactionnel par dialyse pour obtenir une suspension aqueuse de particules structurées,
5. éventuellement on concentre cette suspension,
6. éventuellement on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant les particules.

15

La première étape du procédé s'inspire des techniques connues de polymérisation d'anhydrides de N-carboxy-(aminoacides (NCA), décrites, par exemple, dans l'article « Biopolymers, 15, 1869 (1976) » et dans l'ouvrage de H.R. KRICHELDORF « (-Aminoacid-N-carboxy Anhydride and Related Heterocycles » Springer Verlag (1987).

20

La mise en œuvre de solvants de copolymérisation aprotiques non aromatiques polaire, judicieusement choisis, en évitant toute précipitation et le fait d'avoir recours à une hydrolyse acide en présence d'eau et de solvant organique polaire non aromatique, constituent des modalités nouvelles et inventives qui conduisent à des particules structurées, discrètes et submicroniques à forte capacité de chargement de PA, et qui forment une suspension colloïdale, stable en milieu aqueux. Ces particules ne sont nullement comparables à un précipité aggloméré macroscopique du genre de celui évoqué ci-avant à propos de la proposition antérieure (d).

25

Suivant une variante, à l'issue de l'étape 1, on précipite – de préférence dans l'eau – le copolymère poly(AOO)(pAAI) obtenu et on recueille ce précipité. Cette variante correspond à un mode discontinu de préparation de particules, dans lequel on isole le copolymère poly(AAO)(pAAI) sous forme de précipité formant un produit intermédiaire stable. Ce précipité peut être, par exemple, filtré, lavé et séché.

30

De manière plus préférée encore, les NCA-pAAI sont des NCA d'acide glutamique ou aspartique O-alkylé, par exemple des NCA-Glu-O-Me, NCA-Glu-O-Et ou NCA-Glu-O-Bz (Me = méthyle – Et = Ethyle – Bz = Benzyle).

- De manière connue, la copolymérisation se déroule à une température comprise entre 20 et 120°C, à pression atmosphérique et en présence d'un initiateur aminé, e.g. :  $\text{NH}_3$ .

D'autres paramètres expérimentaux, comme la concentration en NCA et/ou polymère dans le solvant polaire non aromatique (de préférence le NMP), et/ou la concentration ou la nature du cosolvant protique, lors de la synthèse, seront ajustés selon les effets désirés et connus de l'homme de l'art.

- 10 L'hydrolyse acide (étape 2) est réalisée à l'aide d'eau et d'au moins un acide minéral, tel l'acide phosphorique ou chlorhydrique – ce dernier étant préféré – et/ou un acide organique, tel l'acide TriFluoroAcétique (TFA), l'acide acétique, l'acide dichloroacétique, ou les acides organosulfoniques.

- Les proportions eau/acide -exprimées en parties en poids- dans une phase aqueuse acide d'hydrolyse sont, avantageusement :

- de 60/1 à 2/1,
- de préférence 40/1 à 2/1,
- et, plus préférentiellement encore, 20/1 à 2/1.

- 20 Les proportions phase aqueuse acide d'hydrolyse/NMP – exprimées en parties en poids – sont, avantageusement :

- de 5/100 à 200/100
- de préférence, 10/100 à 100/100
- et, plus préférentiellement encore, de 20/100 à 80/100.

25

D'autres paramètres, comme la concentration en polymère, la température du mélange réactionnel, le mode d'ajout de la phase aqueuse acide d'hydrolyse, l'emploi de pression réduite, la durée de la réaction, etc... ; sont ajustés selon les effets désirés et bien connus de l'homme de l'art.

- 30 La neutralisation (étape 3) s'opère, en pratique, par exemple à l'aide de soude.

On élimine ensuite le sel formé à l'issue de la neutralisation, ainsi que le solvant, par tout traitement de séparation physique approprié, par exemple par diafiltration (dialyse) (étape 4), filtration, modification pH, chromatographie...

Cela conduit à une suspension aqueuse de particules structurées qui peut être concentrée, par exemple par distillation ou tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation.

Pour séparer, à l'étape 6, les particules de leur milieu liquide de suspension, on élimine, éventuellement, la phase aqueuse, par exemple par séchage (e.g. à l'étuve), par lyophilisation ou

5 tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation. On récupère, à l'issue de cette étape 6, un solide pulvérulent, de couleur blanche.

Selon une variante, l'étape de concentration peut être réalisée par un traitement chimique, tel qu'un abaissement du pH, qui transforme en acide la partie hydrophile des monomères glutamates, ce qui les rend insolubles dans l'eau. Ces intermédiaires PAA acides peuvent être

10 filtrés, lavés et séchés. Lesdits intermédiaires acides peuvent être neutralisés avec une base chimique dans une étape ultérieure afin d'obtenir une suspension de particules.

Il est à noter que la mise en œuvre des étapes 1, 2, 3, 4 et éventuellement 5 du procédé ci-dessus correspondant à une préparation d'une suspension colloïdale de particules submicroniques et à fort taux de chargement avec les PA.

15 Lors de cette préparation de suspension colloïdale, les PAA amphiphiles poly(AAO)(AAI) de l'étape 2 sont placés dans un milieu aqueux dans lequel au moins une partie des AAI est soluble et au moins une partie des AAO est insoluble. Les PAA existent sous forme de nanoparticules dans ce milieu aqueux.

20 Une alternative pour préparer la suspension de PV selon l'invention consiste à mettre en présence le solide pulvérulent, tel que décrit ci-dessus et en tant que produit et par son procédé d'obtention, avec un milieu aqueux, non solvant des AAO.

Pour effectuer l'association d'un ou plusieurs PA aux particules, il est possible de mettre en œuvre plusieurs méthodes conformément à l'invention. Des exemples, non limitatifs, de ces méthodes sont énumérés ci-après.

25 Selon une première méthode, on effectue l'association de PA aux particules par mise en présence d'une phase liquide (aqueuse ou non) contenant le PA avec la suspension colloïdale de particules.

30 Selon une deuxième méthode, on effectue l'association du PA aux particules par mise en présence d'un PA à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules. Le PA solide peut être, par exemple, sous forme de lyophilisat, de précipité, de poudre ou autre.

Selon une troisième méthode, on met en présence le solide pulvérulent (PAA), tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec une phase liquide (aqueuse ou non) contenant le PA.



Selon une quatrième méthode, on met en présence le solide pulvérulent, tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec le PA sous forme solide. On disperse ensuite ce mélange de solides, dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

- 5 Dans toutes ces méthodes, le PA utilisé peut être sous forme pure ou préformulée.

Compte tenu de la taille nanométrique des particules, la suspension peut être filtrée sur des filtres de stérilisation, ce qui permet d'obtenir, aisément et à moindre coût, des liquides médicamenteux injectables stériles. Le fait de pouvoir, grâce à l'invention, contrôler la taille des particules et

10 atteindre des valeurs de Dh entre 25 et 100 nm, est un atout important.

La présente invention vise, également, de nouveaux produits intermédiaires du procédé décrit ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAA précurseurs de particules.

- 15 Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne une suspension et/ou un solide pulvérulent, tels que définis ci-dessus et/ou tels qu'obtenus par le procédé présenté supra, cette suspension et ce solide comprenant au moins un principe actif, choisi, de préférence, parmi :

- les vaccins
- les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus
- 20 sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse,
- les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée,
- 25 • les acides nucléiques et, préférentiellement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN,
- des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anticancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoïdes.
- et leurs mélanges

- 30 L'invention vise, également, une suspension et/ou le solide pulvérulent chargé(s) en PA nutritionnel, phytosanitaire ou cosmétique

Enfin, l'invention concerne une spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension et/ou du solide pulvérulent chargé(s) en PA et tels que définis ci-dessus.

Selon un autre de ses objets, l'invention vise, également, l'utilisation de ces PV (en suspension ou sous forme solide) chargées en PA, pour la fabrication de médicaments du type systèmes à libération contrôlée de PA.

5 Dans le cas de médicaments, il peut s'agir, par exemple de ceux administrables, de préférence par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale.

Les applications cosmétiques envisageables sont, par exemple, les compositions comprenant un PA associé aux PV selon l'invention et applicables par voie transdermique.

10 Les produits phytosanitaires concernés peuvent être, par exemple, des herbicides, des pesticides, des insecticides, des fongicides, etc...

Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention dans ses différents aspects produit/procédé/application. Ces exemples illustrent la préparation de particules de polyaminoacides chargés ou non en principes actifs, de même qu'ils présentent les caractéristiques de structure et les propriétés de ces particules.

15

## LEGENDES DES FIGURES

Fig. 1 : Nanoparticules correspondant à un copolymère bloc Ia : leucine 50/Glutamate 50 obtenues selon l'enseignement du brevet WO 96/29991.

20

Fig. 2: Nanoparticules obtenues avec le copolymère bloc selon la présente invention (exemple 2) . On notera que la barre ne représente plus ici que 50 nm.

25 Fig 3 Evolution de la concentration en glucose (moyenne en % basal sur 4 chiens) après injection d'une formulation de PV chargée en insuline à raison de 2 UI/kg.

Fig. 4 Evolution de la concentration en insuline sérique (moyenne sur 4 chiens) après injection d'une formulation de PV chargée en insuline à raison de 2 UI/kg

## EXEMPLES

30

**EXEMPLE 1 -Obtention, en suspension aqueuse colloïdale stable et sous forme solide pulvérulente, de particules de vectorisation, à partir d'un polyaminoacide bloc, le poly(Leu/Glu) 40/80 dibloc**

Dans un réacteur de 1 litre thermostaté à 20 °C, on introduit sous agitation 112,4 g de NCA-GluOMe (0,60 mole) et 449 g de N-Méthyl Pyrrolidine-one-2 (NMP). Après dissolution, on  
5 ajoute 21,38 g d'une solution d'ammoniac 0,34 M dans le dioxanne-1,4 (1,25% molaire/NCA). La polymérisation est suivie par mesure du dioxyde de carbone dégagé dans une cloche à gaz et vérifiée par disparition des bandes de vibration caractéristiques des NCA à 1860 et 1790 cm<sup>-1</sup>. Après 30 min, on introduit une solution de 47,17 g de NCA Leucine (0,30 mole) dans 631 g de  
10 NMP. Après 10 min de réaction, la température est augmentée à 60 °C. La polymérisation est suivie comme précédemment et est complète après 2 heures. La température du mélange réactionnel obtenu est augmentée à 80 °C. A 350 g du mélange réactionnel obtenu en fin de l'étape 1 sont ajoutés 31,5 g d'acide chlorhydrique concentré aqueux (35%, 12M) sous agitation mécanique en 30 min. Le réacteur est alors mis sous pression réduite régulée à 600 mBar pendant  
15 6 heures. Un mélange de 31,5 g d'acide chlorhydrique 35 % et de 126 g d'eau est alors ajouté sur 60 min, suivi d'une deuxième phase de vide à 250 mBar pendant 18 heures. Dans cet exemple, la ratio global Eau/Acide chlorhydrique pur est de 7,6/l en masse et le ratio phase aqueuse acide/NMP de 60/100 en masse.

Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à 50 °C, puis neutralisé par la soude aqueuse (35 % de  
20 la masse). La NMP et le chlorure de sodium formé lors de la neutralisation sont éliminés par diafiltration contre 20 volumes d'eau Milli Q, sur membrane de MWCO de 1000 Daltons (système Pellicon II, Millipore). On obtient ainsi une suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation. La suspension de nanoparticules est finalement lyophilisée.

Les teneurs en motifs leucine sont déterminées par résonance magnétique nucléaire du proton  
25 (signaux à 2,10, 2,22 et 2,58 ppm pour 4H du Glu et à 0,85 ppm pour 6H du Leu). La diamètre hydrodynamique moyen (Dh) est 70 nm (selon Md).

**EXEMPLE 2 - Association de l'insuline aux nanoparticules de poly(Leu/Glu) 40/80**

On met en œuvre le mode opératoire Ma. La concentration d'insuline libre, dosée par  
30 chromatographie CLHP, est égale à 0,59 mg/ml et on en déduit la concentration d'insuline associée égale à 1,51 mg/ml. La capacité de chargement d'une solution colloïdale de 10 mg/ml atteint 1,51 mg/ml d'insuline. Ainsi le rapport de la masse d'insuline associée à la masse bLE (Ta) est de 15,1 %.

**EXEMPLE 3- Obtention, en suspension aqueuse colloïdale stable et sous forme solide pulvérulente, de particules de vectorisation à partir d'un PAA bloc poly(Leu/glu) 25/70 dibloc.**

5 146,4 g de NCA GluOMe sont dissous dans 586g de NMP auxquels sont ajoutés 18,43 g d'une solution d'ammoniac 0,48 M dans le méthanol. Lorsque la polymérisation des NCA GluOMe est complète, une solution de 43,9 g de NCA Leu dans 708 g de NMP est introduite et la polymérisation des NCA Leu est poursuivie jusqu'à disparition des monomères. Le milieu est alors porté à 80 °C et on y ajoute, en goutte à goutte, durant 30 min à 1 heure, 129,4 g d'HCl 35 %.

10 Un vide de 600 mBar est appliqué pendant 6 heures, puis 129,4 g d'HCl 35 % supplémentaires sont ajoutés en mélange avec 517,5 g d'eau. Un vide de 250 mBar est alors appliqué pendant 18 heures. Après cette étape, la température est réduite à 50 °C, 1 litre d'eau est introduit, suivi de 280 ml de NaOH 35 % pour ramener le pH à 7,4. La suspension est ensuite filtrée (5 µm), dialysée (seuil de coupure 1 000 Da) dans de l'eau, pour éliminer le solvant et les

15 sels, et enfin filtrée (0,22 µm). Cette suspension peut être utilisée directement ou subir des traitements ultérieurs, tels que la distillation de l'eau (étape 5) ou la lyophilisation (étape 6). Le diamètre hydrodynamique moyen  $D_h$  (selon  $M_d$ ) est 14,8%. Le taux de chargement  $T_a$  de l'insuline, déterminé selon le mode opératoire  $M_a$ , est 35 nm.

20 **EXEMPLE 4 - Obtention, en suspension colloïdale aqueuse stable, de nanoparticules de vectorisation, à partir d'un polyaminoacide bloc, le poly(Leu/Glu) 50/70 dibloc et caractéristiques des nanoparticules**

Dans un réacteur de 0,5 litre thermostaté à 30 °C, on introduit sous agitation 38,9 g de NCA-GluOMe (0,208 mole) et 156 g e N-Méthyl Pyrrolidine-one-2 (NMP). Après dissolution, on

25 ajoute 5,79 g d'une solution d'ammoniac 0,407 M dans le méthanol (1,25 % molaire/NCA). La polymérisation est suivie par mesure du dioxyde de carbone dégagé dans une cloche à gaz et vérifiée par disparition des bandes de vibration caractéristiques des NCA à 1860 et 1790 cm<sup>-1</sup>. Après 30 min, on introduit une solution de 23,3 g de NCA Leucine (0,148 mole) dans 263 g de NMP. Après 10 min de réaction, la température est augmentée à 60 °C. La polymérisation est

30 suivie comme précédemment et est complète après 1-2 heures. La température du mélange réactionnel obtenu précédemment est augmentée à 80 °C. 41,9 g d'acide chlorhydrique aqueux (35 % de la masse) sont ajoutés au milieu réactionnel sous agitation mécanique en 30 min. Le réacteur est alors mis sous pression réduite réglée à 600 mBar pendant 6 heures. Un mélange de

41,9 g d'acide chlorhydrique 35 % et de 167,5 g d'eau est alors ajouté sur 60 min, suivi d'une deuxième phase de vide à 250 mBar pendant 18 heures. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à 50 °C, puis neutralisé par la soude aqueuse (35 % de la masse). La NMP et le chlorure de sodium formés lors de la neutralisation, sont éliminés par diafiltration contre 20 volumes d'eau Milli Q, sur membrane de MWCO de 1 000 Daltons (système Pellicon II, Millipore). On obtient ainsi une suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation. La suspension de nanoparticules est finalement lyophilisée.

Le diamètre hydrodynamique moyen  $D_h$  est mesuré selon  $M_d$  sur des suspensions aqueuses des lyophilisats. Le taux de chargement  $T_a$  de l'insuline est déterminé selon le mode opératoire  $M_a$ .

10

**EXEMPLE 5      Obtention, en suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation, à partir d'un polyaminoacide bloc, le poly(Leu/Glu) 25/35 dibloc et caractéristiques des nanoparticules**

Dans un réacteur de 0,5 litre thermostaté à 30 °C, on introduit sous agitation 38,9 g de NCA-GluOMe (0,208 mole) et 156 g de N-Méthyl Pyrrolidine-one-2 (NMP). Après dissolution, on ajoute 5,78 g d'une solution d'ammoniac 0,452 M dans le méthanol (1,25 % molaire/NCA). La polymérisation est suivie par mesure de dioxyde de carbone dégagé dans une cloche à gaz et vérifiée par disparition des bandes de vibration caractéristiques des NCA à 1860 et 1790  $\text{cm}^{-1}$ . Après 30 min, on introduit une solution de 23,3 g de NCA Leucine (0,149 mole) dans 5 219 g de NMP. Après 10 min de réaction, la température est augmentée à 60 °C. La polymérisation est suivie comme précédemment. Elle est complète après 1-2 heures. La température du mélange réactionnel obtenu précédemment est augmentée à 80 °C. 42,0 g d'acide chlorhydrique aqueux (35 % de la masse) sont ajoutés au milieu réactionnel sous agitation mécanique en 30 min. Le réacteur est alors mis sous pression réduite régulée à 600 mBar pendant 6 heures. Un mélange de 42,0 g d'acide chlorhydrique 35 % et de 167,9 g d'eau est alors ajouté sur 60 min, suivi d'une deuxième phase de vide à 250 Mbar pendant 18 heures. Le mélange réactionnel est ensuite refroidi à 50 °C, puis neutralisé par la soude aqueuse (35% de la masse). La NMP et le chlorure de sodium formés lors de la neutralisation, sont éliminés par diafiltration contre 20 volumes d'eau Milli Q, sur membrane de MWCO de 1000 Daltons (système Pellicon II, Millipore). On obtient une suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation La suspension de nanoparticules est finalement lyophilisée.

Les teneurs en motifs leucine sont déterminées par résonance magnétique nucléaire du proton (signaux à 2,10, 2,22 et 2,58 ppm pour 4H du Glu et à 0,85 ppm pour 6H du Leu). Le diamètre

hydrodynamique moyen  $D_h$  est mesuré selon Md sur des suspensions aqueuses des lyophilisats.  
Le taux de chargement de l'insuline est déterminé selon Ma.

**EXEMPLE 6      Obtention, en suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules**  
**5    de vectorisation, d'un polyaminoacide bloc, le poly(Leu/glu) 50/150 dibloc et**  
**caractéristiques des nanophases**

Dans un réacteur de 0,5 litre thermostaté à 30 °C, on introduit sous agitation 46,4g de NCA-GluOMe (0,248 mole) et 186 g de N-Méthyl Pyrrolidine-one-2 (NMP). Après dissolution, on ajoute 6,90g d'une solution d'ammoniac 0,19 M dans le méthanol (1,25 % molaire/NCA). La  
10 polymérisation est suivie par mesure du dioxyde de carbone dégagé dans une cloche à gaz et vérifiée par disparition des bandes de vibration caractéristiques des NCA de 1 860 et 1 790  $\text{cm}^{-1}$ . Après 30 min, on introduit une solution de 12,97g de NCA Leucine (0,083 mole) dans 218 g de NMP. Après 10 min de réaction, la température est augmentée à 60 °C. La polymérisation est suivie comme précédemment. Elle est complète après 1-2 heures. La température du mélange  
15 réactionnel obtenu précédemment est augmentée à 80 °C. 40,3 g d'acide chlorhydrique aqueux (35 % de la masse) sont ajoutés au milieu réactionnel sous agitation mécanique en 30 min. Le réacteur est alors mis sous pression réduite réglée à 600 mBar pendant 6 heures. Un mélange de 40,3 g d'acide chlorhydrique 35 % et de 161,3 g d'eau est alors ajouté sur 60 min, suivi d'une deuxième phase de vide à 250 mBar pendant 18 heures. Le mélange réactionnel est ensuite  
20 refroidi à 50 °C, puis neutralisé par la soude aqueuse (35 % de la masse).

La NMP et le chlorure de sodium formé lors de la neutralisation, sont éliminés par diafiltration contre 20 volumes d'eau Milli Q, sur membrane de NWCO de 1 000 Daltons (système Pellicon II, Millipore). On obtient une suspension colloïdale aqueuse stable de nanoparticules de vectorisation. La suspension de nanophases est finalement lyophilisée.

25 Les teneurs en motifs leucine sont déterminées par résonance magnétique nucléaire du proton (signaux à 2,10 ; 2,22 et 2,58 ppm pour 4H du Glu et à 0,85 ppm pour 6H du Leu). Le diamètre hydrodynamique moyen  $D_h$  est mesuré selon Md. Le taux de chargement de l'insuline est déterminé selon Ma.

30 **EXEMPLE 7      Exemple comparatif de la nature des particules formées avec**  
**l'enseignement du brevet PCT WO 96/29991**

Les particules obtenues par l'enseignement du brevet WO 96/29991 sont celles apparaissant sur la Fig. 1. Avantageusement, les particules selon l'invention sont celles apparaissant sur la Fig. 2 annexée correspondant à une photographie prise au microscope électronique à transmission.

- Les différences de morphologie et de taille apparaissent de manière flagrante en comparant la Fig. 1 qui représente des PV selon l'art antérieur, d'une part, et la Fig. 2 montrant des PV selon l'invention, d'autre part. On constate ici une différence notable de morphologie. Les PV de la Fig. 2 sont telles que la majorité des particules plus grande taille présente une forme allongée.

**EXEMPLE 8- Test de Stabilité d'une suspension colloïdale préparée selon l'exemple 2 avec le polymère poly(Leu/Glu) 40/80**

- La poudre pulvérulent de l'exemple 2 est dissoute à raison de 60 mg/ml de poudre dans un tampon phosphate. Le pH a été ajusté à 7.3 et l'osmolalité de la suspension a été ajustée à 300 mOsm/kg à l'aide d'une solution de NaCl 5M. La solution a été filtrée (0.22µm) avant d'être réparties à raison de 5ml en flacons stériles de 10ml. La stabilité des échantillons a été évaluée sur une durée de 4 mois. La moitié des échantillons a été gardée à 4°C (± 2°C) pendant que les autres échantillons sont maintenus à la température du laboratoire : 25 °C (± 5°C). A des temps déterminés les échantillons sont prélevés du lieu de stockage et équilibrés 1 heure à température ambiante avant l'analyse. Les méthodes analytiques sont détaillées, les résultats étant présentés sous forme de deux tableaux.

20

- 1) Vérification de l'homogénéité de la solution colloïdale: Sans agiter la suspension, on effectue trois prélèvements de 100 µl de façon à représenter l'état de la solution en haut, au milieu et en bas du flacon. L'indice de réfraction de chaque prélèvement est mesuré à 25°C sur un réfractomètre d'Abbe étalonné par rapport à l'eau pure. Trois lectures sont réalisés pour chaque prélèvement et l'on compare les trois moyennes. Toute variation de concentration de la solution se traduirait par une différence de l'indice de réfraction.

25

- 2) Mesure du diamètre hydrodynamique: Un prélèvement de 100 µl de la solution à analyser est dilué 120 fois par une solution de NaCl 0.15M et le Dh des particules colloïdales est mesuré selon le protocole Md.

30

- 3) Mesure de la viscosité: Les mesures sont réalisées sur des prélèvements de 0.75 ml à l'aide d'un rhéomètre AR1000 (TA instruments) équipé d'une géométrie Cône/Plan (cône 4 cm/2°C) à

une température de 20.0°C  $\pm$  0.1°C (régulation par effet Pelletier). La courbe viscosité en fonction du gradient de cisaillement est enregistrée pour des gradients variant de 1 à 100 s<sup>-1</sup>. A ces concentrations les solutions sont légèrement rhéofluidifiantes et la valeur de viscosité retenue est prise pour un gradient de 10 s<sup>-1</sup>.

5

Les résultats obtenus après vieillissement à 4°C et 25°C sont rassemblés dans les tableau I et II.

Tableau I - Vieillissement à 4°C

		T 0	T1	T2	T3	T4	T5
nombre de jours en vieillissement		0	9	28	59	92	127
homogénéité (indice)	prélèvement 1 cm	1.3443	1.3442	1.3447	1.3438	1.3440	1.3443
	prélèvement 1.5 cm	1.3442	1.3442	1.3446	1.3439	1.3439	1.3440
	prélèvement 2 cm	1.3443	1.3442	1.3448	1.3439	1.3440	1.3440
diamètre hydrodynamique (nm)		45	45	44	43	44	44
viscosité (mPa.s)		246	246	250	250	262	250

10

Tableau II - Vieillissement à 25°C

		T 0	T1	T2	T3	T4	T5
nombre de jours en vieillissement		0	9	28	59	92	127
homogénéité (indice)	prélèvement 1 cm	1.3443	-	1.3448	1.3441	1.3440	1.3442
	prélèvement 1.5 cm	1.3442	-	1.3448	1.3441	1.3440	1.3442
	prélèvement 2 cm	1.3443	-	1.3447	1.3441	1.3440	1.3442
diamètre hydrodynamique (nm)		45	-	44	44	45	46
viscosité (mPa.s)		246	-	246	250	284	240

#### EXEMPLE 9- Test de Libération d'insuline chez l'animal après administration d'une Suspension de Particules contenant de l'Insuline

15

Une formulation est préparée à partir de PV (de l'exemple 3) et d'insuline, les quantités de chaque étant déterminées d'après les mesures de taux d'association (Ma).

Un groupe de 4 chiens beagle (mâles et femelles) pesant entre 10 et 12 kg sont mis à jeun 18 heures. Une préparation est formulée et se compose de 80 UI d'insuline et 56 mg de PV dans 1 ml



de tampon PBS. Les chiens reçoivent ensuite une administration sous-cutanée de cette préparation d'insuline à raison de 2 UI/kg de poids. Le sang prélevé pour un dosage du glucose et d'insuline avant (-2h, -1h et 0h) et après (1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 40h, 44h, 48h) l'injection. Les concentrations en glucose sont mesurées dans les prélèvements par la  
5 méthode glucose-oxydase et l'insuline sérique est dosée en utilisant une méthode radio-immunologique. La Fig. 3 donne la moyenne de l'évolution du glucose pour cette formulation. La fig. 4 donne la moyenne de l'évolution de l'insuline sérique pour cette formulation.

Cet exemple montre, au travers de l'activité biologique, la non dénaturation de la protéine ainsi  
10 que la possibilité de prolonger la libération de > 24h, deux aspects avantageux de la présente invention.

**REVENDEICATIONS :**

1 - Suspension colloïdale de particules submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) (PA), ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés :

• à base de polyaminoacides (PAA) amphiphiles, linéaires, à enchaînements (-peptidiques et comprenant au moins deux types différents d'acides aminés récurrents AAI hydrophiles et AAO neutres hydrophobes, les acides aminés de chaque type étant identiques ou différents entre eux,

• et aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée, caractérisée :

○ en ce que le ou les AAI est(sont) choisi(s) parmi des acides aminés à chaîne latérale ionisable, les acides aminés naturels Glu et Asp sous forme carboxylique et/ou sous forme de sels étant particulièrement préférés,

○ en ce que le ou est AAO est(sont) choisi(s) dans le groupe comprenant les acides aminés neutres naturels, de préférence ceux appartenant au sous-groupe comportant : Leu, Ile, Val, Ala, Pro, Phe ;

○ en ce qu'elle est stable à pH compris entre 4 et 13 en l'absence de tensioactif(s),

○ par un taux de chargement Ta avec l'insuline, exprimé en % de masse d'insuline associée par rapport à la masse et mesuré selon un mode opératoire Ma, Ta étant tel que :

$$\Delta 7 \leq Ta,$$

$$\Delta \text{ de préférence, } 8 \leq Ta \leq 50,$$

$$\Delta \text{ et, plus préférentiellement encore, } 10 \leq Ta \leq 30,$$

○ et par un diamètre hydrodynamique moyen Dh exprimé en nm et mesuré selon un mode opératoire Md, Dh étant tel que :

$$\Delta 10 \text{ nm} \leq Dh \leq 150 \text{ nm},$$

$$\Delta \text{ de préférence, } 20 \text{ nm} \leq Dh \leq 100 \text{ nm}.$$

2 - Suspension selon la revendication 1, caractérisée en ce que les PAA constitutifs des particules sont des PAA « blocs » pour lesquels le rapport molaire  $AAO/(AAI+AAO)$ , exprimé en %, est tel que :

$$\Delta 10\% \leq AAO/(AAI+AAO) \leq 70\%,$$

5  $\Delta$  de préférence,  $20\% \leq AAO/(AAI+AAO) \leq 60\%$

et pour lesquels le degré de polymérisation DP de la chaîne est compris entre 30 et 600, de préférence entre 50 et 100 et, plus préférentiellement encore, entre 60 et 150.

3 - Suspension selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les PAA constitutifs des particules sont des PAA « diblocs »

10 4 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est aqueuse et stable.

5 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les particules comprennent au moins un principe actif PA.

15 6 - Solide pulvérulent, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 5

7 - Procédé de préparation du solide pulvérulent selon la revendication 6, caractérisée en ce que :

1) on réalise une copolymérisation de monomères formés par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) d'au moins deux types différents, d'une part, des  
20 NCA-pAAI (« pAAI » désignant des précurseurs d'AAI) et d'autre part, des NCA-AAO, en présence :

- d'au moins un solvant polaire non aromatique, de préférence choisi dans le groupe comprenant : la N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiMéthylsulfOxyde (DMSO), le  
25 DiMéthylAcétamide (DMAc), la pyrrolidone ; la NMP étant plus particulièrement préférée ;

- et éventuellement d'au moins un co-solvant sélectionné parmi les solvants aprotiques (de préférence le dioxanne-1,4) et/ou les solvants protiques (de préférence la pyrrolidone) et/ou l'eau et/ou les alcools, le  
30 méthanol étant particulièrement préféré ;

2) On transforme les motifs récurrents pAAI du copolymère obtenu à l'étape 1 en motifs récurrents AAI en mettant en œuvre une hydrolyse – de préférence acide – pour laquelle on met en présence le copolymère obtenu à l'étape 1 avec une phase aqueuse d'hydrolyse acide + eau ;

3) on neutralise le milieu réactionnel

4) éventuellement on dialyse le milieu réactionnel pour purifier la suspension aqueuse de particules structurées

5) éventuellement on concentre cette suspension de l'étape 4

5 6) on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant les particules.

8 - Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que, à l'issue de l'étape 1, on précipite – de préférence dans l'eau – le copolymère poly (AAO)(pAAI) obtenu et on recueille le précipité.

10 9 - Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on met en présence d'un milieu aqueux non solvant des AAO, le solide pulvérulent selon la revendication 6 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 7.

15 10 - Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes 1,2,3, 4 et éventuellement 5 du procédé selon la revendication 7.

11 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'on effectue l'association de PA aux particules, par mise en présence d'une phase liquide contenant le PA avec la suspension colloïdale de particules.

20 12 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'on effectue l'association du PA aux particules par mise en présence d'un PA à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules.

25 13 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 6 et /ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 7, avec une phase liquide contenant le PA.

14 - Procédé de préparation de la suspension selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 6 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 7, avec le PA sous forme solide et en ce que l'on disperse ce mélange de solides dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

30 15 - Produits intermédiaires du procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAA précurseurs de particules.

16 - Suspension selon la revendication 5 et/ou obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14 et/ou solide pulvérulent selon la revendication 6 comprenant un moins un principe actif choisi, de préférence, parmi :

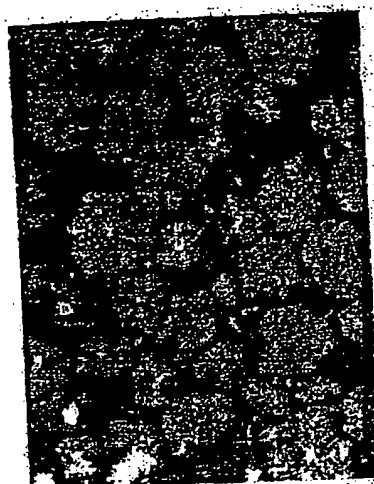
- les vaccins,
- les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse,
- les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée,
- les acides nucléiques et , préférentiellement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN,
- des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anti-cancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoïdes,
- et leurs mélanges

17 - Suspension selon la revendication 5 et/ou suspension obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, et/ou solide pulvérulent selon la revendication 6, comprenant au moins un principe actif nutritionnel, phytosanitaire ou cosmétique.

18 - Spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension et/ou du solide pulvérulent selon la revendication 16 ou 17.

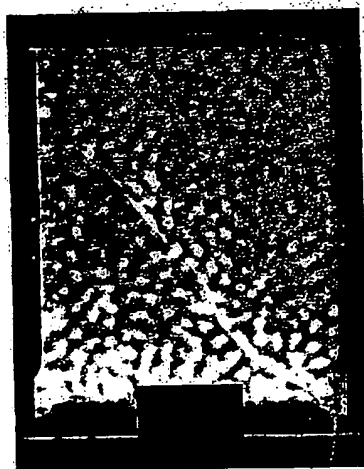
1/2

2801226



200 nm

**Fig. 1**



50 nm

**Fig. 2**

2/2

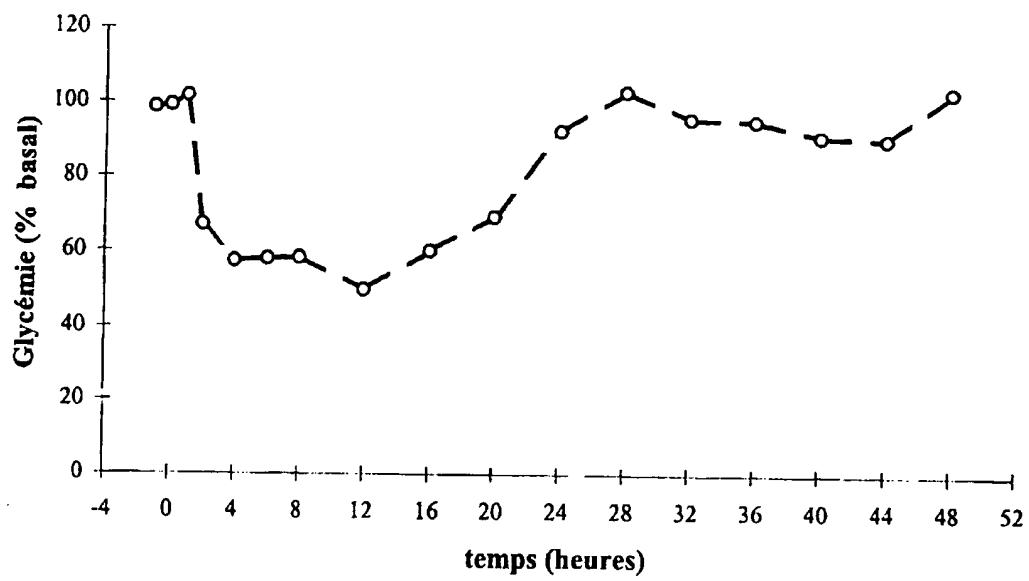


FIG.3

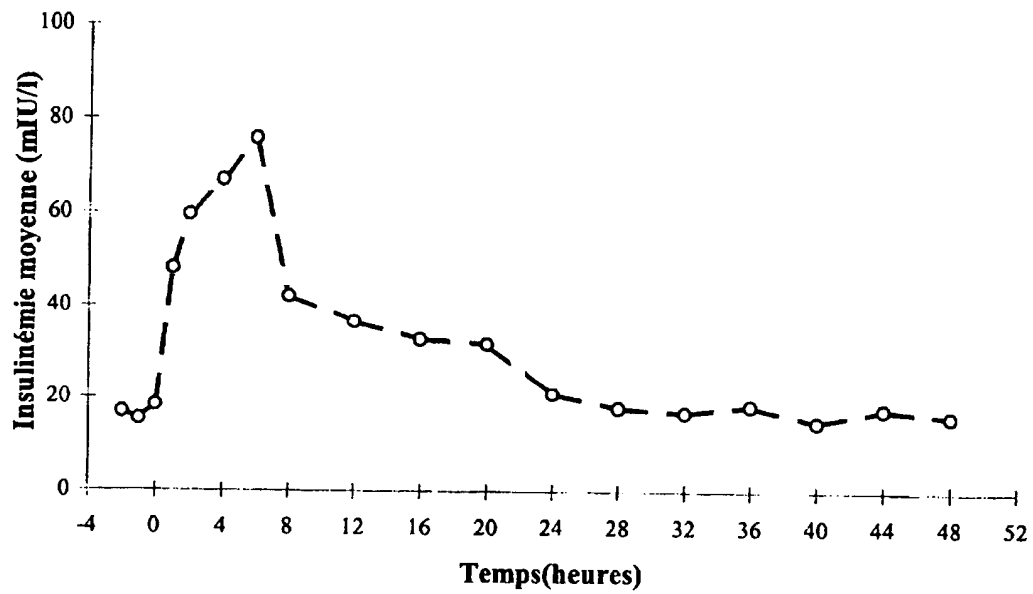


FIG.4

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	FR 2 746 035 A (FLAMEL TECH SA) 19 septembre 1997 (1997-09-19) * revendications; exemples *	1-18	B01J13/00 B01J13/02 A61K9/16 A61K9/51 A61K9/52 A61K7/00
A,D	US 5 904 936 A (HUILLE SYLVAIN ET AL) 18 mai 1999 (1999-05-18)		<b>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (InLCL.7)</b>  A61K B01J
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 août 2000		Meertens, J	
<b>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</b> X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**